

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年11月21日 (21.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/092829 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09, C07K 19/00, C12N 1/21

(21) 国際出願番号:
PCT/JP02/04735

(22) 国際出願日:
2002年5月16日 (16.05.2002)

(25) 国際出願の言語:
日本語

(26) 国際公開の言語:
日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-147341 2001年5月17日 (17.05.2001) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西村 紀 (NISHIMURA,Osamu) [JP/JP]; 〒666-0112 兵庫県川西市大和西1丁目54番地の16 Hyogo (JP). 末永正人 (SUENAGA,Masato) [JP/JP]; 〒745-0844 山口県徳山市速玉町5-1-2 O 1 Yamaguchi (JP). 伊藤隆司 (ITO,Takashi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ704号 Ibaraki (JP). 北田千恵子 (KITADA,Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府 堺市 南向陽町1丁2番8号 Osaka (JP).

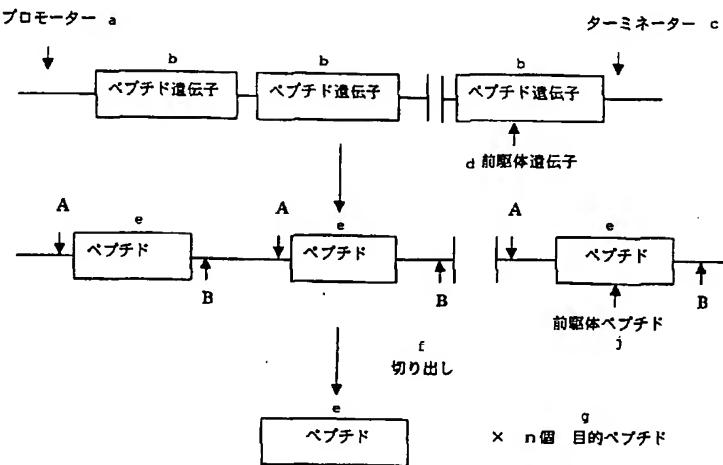
(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI,Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲2丁目8番7号 福岡ビル 9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[統葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PEPTIDE

(54) 発明の名称: ベプチドの製造法



(57) Abstract: It is intended to provide a process whereby a target peptide can be efficiently produced in a large amount via gene recombination. A process comprising a combination of the excision of a target peptide with the use of right-handed scissors (S-cyanation reaction) and left-handed scissors (bromocyan treatment, enterokinase, factor Xa-treatment, etc.) with the tandem repeat method which is useful in synthesizing a peptide (in particular, a low-molecular weight peptide) in a large amount with the use of gene recombination techniques.

A1

WO 02/092829

a...PROMOTER
b...PEPTIDE GENE
c...TERMINATOR
d...PRECURSOR GENE
e...PEPTIDE
f...EXCISION

g...TARGET PEPTIDE (COUNT: n)
h...A: LEFT-HANDED SCISSORS
(N-TERMINAL EXCISION AND EXPOSURE)
i...B: RIGHT-HANDED SCISSORS
(C-TERMINAL EXCISION AND EXPOSURE)
j...PRECURSOR PEPTIDE

[統葉有]



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、遺伝子組換え法で目的ペプチドを効率的、かつ大量に製造できる方法
を提供することを課題とする。

右手用はさみ (S-シアノ化反応) と左手用はさみ (プロムシアン処理、エンテロ
キナーゼ、ファクターXa処理等) による目的ペプチドの切り出しとタンデムリピー
ト法とを組み合わせた本発明の方法は、遺伝子組換え技術によるペプチド、特に、
低分子量のペプチドの大量合成に有用である。

明細書

ペプチドの製造法

5 技術分野

本発明は、目的ペプチドを繰り返し連結した前駆体タンパク質として安定的に微生物に発現させ、次いで該前駆体タンパク質のペプチド結合を切断することにより、目的のペプチドまたはその塩を製造する方法に関する。

10 背景技術

ペプチドを合成する方法には、有機化学的な方法、酵素を用いる方法、それに遺伝子組換え技術による方法の3種が知られている。

この内、遺伝子組換え技術を用いる方法では、ペプチドの直接発現法による合成は大変困難である。その理由は、ペプチドを直接発現させても、作られたペプチドは、菌体内のプロテアーゼで次々と速やかに分解されてしまうためである。

そのために、遺伝子組換え技術を用いてペプチドを合成する際には、保護タンパク質との融合タンパク質として発現させる融合タンパク質法が一般的に用いられている。保護タンパク質としては、後の精製を迅速、かつ効率的に行うために、アフィニティクロマトグラフィーが使用できるプロテインA、 β ガラクトシダーゼ等が有利に用いられる。この融合タンパク質から、目的のペプチドを特異的に切り出さなければならないが、切り出しの方法には、プロムシアン(MetのC末端側を切断する)等の化学的な方法とエンテロキナーゼ切断サイト(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)やファクターXa切断サイト(Ile-Glu-Gly-Arg)という配列の直後C末端側を切断する等の酵素を用いる方法がよく知られている。

また、融合タンパク質の保護タンパク質としてFGFムテイン(CS23)を特異的な化学切断法としてS-シアノ化反応を組み合わせた新しいペプチド合成法が報告されている(E P 0 8 8 7 4 1 7)。この方法は、CS23のヘパリンへの強いアフィニティーを利用して融合タンパク質の精製を効率良く、かつ容易にし、さらに、システインを介することによって、この位置でのS-シアノ化反応(CysのN末端側を切断す

る)による特異的切断を図り、目的のペプチドを切り出すことができる有用な方法であり、しかも、多くのペプチドで生理活性の発現に必須のC末端アミド体の調製も可能な方法である。また、この方法は、分子内にシステイン残基を含まないペプチドすべてに適用可能である。

一方、一般的に融合タンパク質法は、保護タンパク質と目的ペプチドとの分子量差が大きく、微生物(大腸菌)のタンパク質合成能力を無駄なく利用しているとは必ずしも言えない面があるのも事実である。そこで、目的ペプチド遺伝子を1分子中にタンデムにいくつも繋いで、菌体内で安定な前駆体タンパク質として発現させ、かかる後に目的ペプチドを切り出すタンデムリピート法が試みられているが、その成功例は少ない。その原因は、従来、目的ペプチドのN末端側を切り出し、露出させる方法(いわば、左手用はさみ)は、プロムシアン処理、ファクターXa法等が知られているが、C末端を特異的に切り出し、露出させる方法(いわば、右手用はさみ)に適切なものが無かったことに起因している。

本発明は、遺伝子組換え法で目的ペプチドを効率的、かつ大量に製造できる方法を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明者らは、このC末端を特異的に切り出し、露出させる方法について、鋭意考察を加えた結果、先に述べたS-シアノ化反応が融合タンパク質法への応用と同様に、予想外にもタンデムリピート法によるペプチドの合成にも有効に利用できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明者らは、タンデムリピート法に必要な左手用、右手用の両方のはさみを入手することに成功し、特に、これまで遺伝子組換え法での合成が困難であった分子量の小さいペプチドの効率的かつ大量の調製が可能となった(図1)。

25 このように、これら2つの切断方法を組み合わせることにより、タンデムリピート法による分子量の小さいペプチドの効率的かつ大量の調製が可能となった(図2)。

すなわち、本発明は、

(1) 目的ペプチドのN末端およびC末端に酵素または化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質を酵素または化学的に切断することを特徴とする目的ペプチドまたはその塩の製造法（以下、製造法A）、
5 (2) 目的ペプチドのN末端に酵素または化学的な切断サイトを、C末端に化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質を酵素または化学的に切断することを特徴とする前記（2）記載の製造法、
10 (3) 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシスティニルペプチド（ただし、システィニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質中の各目的ペプチドのN末端側をプロムシアンまたはタンパク質分解酵素で切断し、C末端側のシステインまたはシスティニルペプチドのN末端側で切断反応に付すことを特徴とする目的ペプチドまたはその塩の製造法（以下、製造法B）、
15 (4) 前駆体タンパク質が組換え型前駆体タンパク質である前記（1）～前記（3）記載の製造法、
(5) 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である前記（3）記載の製造法、
20 (6) S-シアノ化反応を2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩(DMAP-CN)またはCN⁻イオンの存在下で行う（5）記載の製造法、
(7) タンパク質分解酵素がエンテロキナーゼ、ファクターXaまたはトロンビンである前記（3）記載の製造法、
25 (8) (イ) プロムシアンを用いる場合、各目的ペプチドのN末端にメチオニン残基を連結し、目的ペプチドがメチオニン残基を有さない、
(ロ) タンパク質分解酵素がエンテロキナーゼである場合、各目的ペプチドのN末端にAsp-Asp-Asp-Asp-Lys等のエンテロキナーゼ切断サイトを連結し、目的ペプチドがAsp-Asp-Asp-Asp-Lys等で表されるアミノ酸配列を有さない、

(ハ) タンパク質分解酵素がファクターXaである場合、各目的ペプチドのN末端にIle-Glu-Gly-Arg等のファクターXa切断サイトを連結し、目的ペプチドがIle-Glu-Gly-Arg等で表されるアミノ酸配列を有さない、

5 (二) タンパク質分解酵素がトロンビンの場合、各目的ペプチドのN末端にGly-Phe-Arg等、トロンビン切断サイトを連結し、目的ペプチドがGly-Phe-Arg等で表されるアミノ酸配列を有さない前記(3)記載の製造法、

(9) 目的ペプチドがKISS-1ペプチドである前記(1)～(3)記載の製造法、

10 (10) 目的ペプチドがGPR8リガンドである前記(1)～(3)項記載の製造法、

(11) GPR8リガンドのN末端側にエンテロキナーゼ切断配列を、C末端側にシステイン残基を付加して3回繰り返し連結した前駆体タンパク質中の各GPR8リガンドのN末端側をエンテロキナーゼで切断し、C末端側のシステインのN末端側で切断反応に付することを特徴とするGPR8リガンドまたはその塩の製造法、

(12) GPR8リガンドが配列番号：44で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドである前記(10)または(11)項記載の製造法、

(13) GPR8リガンドが配列番号：44、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48、配列番号：49または配列番号：50で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである前記(10)または(11)項記載の製造法、

(14) GPR8リガンドが配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである前記(10)または(11)記載の製造法、

25 (15) 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するDNA、

(16) 前記(15)記載のDNAを含有する組換えベクター、
(17) FERM BP-8023で標示される形質転換体：エシェリヒア コリ
MM294 (DE3) / pTCGPR3に保持される(16)項記載の組換えベ
クター、
5 (18) 前記(16)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
(19) FERM BP-8023で標示される形質転換体：エシェリヒア コリ
MM294 (DE3) / pTCGPR3である前記(18)項記載の形質転換体

(20) 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断
10 配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システ
イニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニ
ン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰
り返し連結した前駆体タンパク質またはその塩、および
(21) 前駆体タンパク質が前記(18)記載の形質転換体を培養して製造された
15 組換え型前駆体タンパク質である第(4)項記載の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のペプチド製造法の概略図を示す。
図中で、下向きの矢印を左手用はさみ(N末端切り出し及び露出方法)-Aと、上向
20 きの矢印は右手用はさみ(C末端切り出し及び露出方法)-Bとした。左手用はさみと
しては、プロムシアン処理、ファクターXa法、エンテロキナーゼ法等のC末端側で
ペプチドを切断し、新たなN末端を露出できる酵素があげられる。方法としては、M
etあるいはIle-Glu-Gly-Arg、Asp-Asp-Asp-LysのC末端側を切断し、目的ペ
プチドのN末端を露出させる。
25 右手用はさみはS-シアノ化を行い、CysのN末端側を切断し、目的ペプチドのC末端
を露出させる。
図2は、本発明のペプチド製造法の概略図を示す。
図3は、本発明のペプチド製造法を用いたK i S S - 1ペプチド製造法の概略図を
示す。

Xxx: Met (プロムシアン) or Ile-Glu-Gly-Arg (ファクター Xa), Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ((Enterokinase), 等である。

但し、(Xxx)は一般的に目的ペプチドがMetを含む場合にはファクターXa やエンテロキナーゼの他にさらに(本 Kiss-1 ペプチドの場合には考慮しなくてよい)。①目的ペプチドがProを含まない時にはProline Specific endopeptidase、②目的ペプチドがLysを含まない時にはlysyl endopeptidase、③目的ペプチドがArgを含まない時にはArginylendopeptidase、④目的ペプチドがGluとAspを含まない時にはV8プロテアーゼ、⑤目的ペプチドが塩基性アミノ酸を含まない時にはトリプシン、⑥目的ペプチドが芳香族アミノ酸を含まない時にはキモトリプシン等が使用できる。

10 図4は、実施例1～3で製造されたh G P R 8 L (配列番号：4 4) のG P R 8 発現CHO細胞に対するG T P γ S 結合活性を測定した結果を示す。横軸はh G P R 8 L の濃度を、縦軸はG T P γ S 結合活性を示す。—●—は合成したh G P R 8 L (配列番号：4 4) を、—○—は本発明のペプチド製造法 (タンデムリピート法) で製造したh G P R 8 L (配列番号：4 4) を用いた時の結果を示す。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法において、目的のペプチド（単に「目的ペプチド」と称する場合がある）としては、切り出しに用いる方法による切断サイトを分子内にもたないペプチドであれば何れのペプチドを用いても良く、そのアミノ酸配列は遺伝子組換え技術を用いで生産出来るものであれば何でもよい。

目的ペプチドのアミノ酸残基の数は特に限定されないが、通常、約10～100個程度、好ましくは約10～50個程度、さらに好ましくは約20～40個程度である。

目的ペプチドの分子量も特に限定されないが、通常、約1000～10000ダルトン、好ましくは約1000～5000ダルトン、さらに好ましくは約2000～4000個程度である。

目的ペプチドの具体例としては、例えば、K i S S - 1ペプチド (WO 00 / 2 4 8 9 0) 、R F R P - 1 (WO 00 / 2 9 4 4 1) 、アペリン (WO 99 / 3 3 9 7 6) 、P r R P (WO 97 / 2 4 4 3 6) 、G A L P (WO 99 / 4 8 9 2 0

)、GPR8リガンド(WO1/98494)、アンジオテンシン、プラジキニン、カルシトニン、コナントキン、コルチコトロピン放出因子、ダイノルフィン、エンドルフィン、エンケファリン、ガラニン、ガストリン、グルカゴン、成長ホルモン放出因子、FMRF-アミド、ニューロキニン、ニューロメジン、ニューロペプチド、ノシセプチン、ノシスタチン、オレキシン-B、セクレチン、サブスタンスP、ウロコルチン、VIP、PACAP、ACTH、各種オピオイドペプチド類および上記のペプチドフラグメント等が挙げられ、なかでもKiSS-1ペプチド、RFRP-1、GPR8リガンド、アペリン、PrRP、GALPなどが好ましい。
。

10 目的ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。

KiSS-1ペプチドとしては、例えば、WO00/24890に記載のヒトKiSS-1ペプチドが用いられ、具体的には、配列番号：1で表される54個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。
。

「配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、ペプチドのもつ活性(例えば、ペプチドとレセプターの結合活性、ペプチドによって引き起こされるレセプター発現細胞の細胞刺激活性など)などが、実質的に同じであることを意味する。具体的には、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられる。

より具体的には、KiSS-1ペプチドとしては、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、③配列番号：1

で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列（配列番号：2で表されるアミノ酸配列）で表されるペプチド、④配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、⑤配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、⑥配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第35～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチドなどがあげられる。

上記KISS-1ペプチドは、WO 00/24890に記載のレセプタータンパク質OT7T175に対し、リガンド活性を有する。

RFRP-1としては、例えば、Hinuma et al., Nature Cell Biology, Vol 2, p703-708 (2000) に記載のRF amide-related peptidesやWO 00/29441に記載のポリペプチドなどが挙げられ、具体的には、配列番号：1または配列番号：9で表されるアミノ酸配列列を含有し、Hinuma et al., Nature Cell Biology, Vol 12, p703-708 (2000) やWO 00/29441に記載のレセプターOT7T02 2に対してリガンド活性を有するペプチドであれば如何なるものであってよい。

より具体的には、例えば、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが用いられる。

アペリンとしては、例えば、Biochem Biophys. Res. Commun., 251, 471-476, (1998) に記載のアペリン-36（配列番号：18で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド）、アペリン-13（配列番号：18の第24～36番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、アペリン-13のN末端のアミノ酸（Gln）がピログルタミン酸化したペプチドなどが挙げられ、そのレセプターであるAPJ (O'Dowd, B.F., et al., Gene, 436, 355-359, 1993) に対し、リガンド活性を有するペプチドであれば、如何なるものであってよい。具体的には、例えばWO 99/33976に記載の「配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質に結合能を有するポリペプチド」などがあげられる。

P r R P (19P2リガンド) としては、例えば、WO 97/24436に記載のペプチドが用いられ、具体的には、ウシ19P2L (b19P2LまたはウシP r R P) (配列番号：20)、ラット19P2L9 (r19P2LまたはラットP r R P) (配列番号：21)、ヒト19P2L (h19P2LまたはヒトP r R P) (配列番号：22) と同一もしくは実質的に同一のペプチドまたはそれらのアミド、エステルもしくはその塩などが挙げられる。

「実質的に同質」とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。従って、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

10 例えば、配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドなどの他に、配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列とそれぞれ約50～99.9%（好ましくは70～99.9%、より好ましくは80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%）の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどがあげられる（但し、当該ペプチドはアミノ酸配列中にシステインを含まないものとする）。

配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同一なペプチドのより具体的な例としては、例えば、配列番号：23（配列番号：23中、第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはOH、GlyまたはGly-Argを示す）に記載の部分ペプチドを含有するペプチドなどがあげられる。

より具体的には、配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列に1個以上80個以下、好ましくは1個以上50個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：20、配列番号：21または配列番

号：22で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチドなどが挙げられる。

さらに具体的には、例えば、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25
5、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42または配列番号：43で表されるアミノ酸配列を有するペプチドなどが挙げられる。

10 また、本発明のPrRPには、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnがピログルタミン酸化したものなども含まれる。

GALPとしては、WO 99/48920に記載のペプチドが用いられる。

GPR8リガンドとしては、7回膜貫通型レセプタータンパク質GPR8 (O'Dowd, B. F. et al., Genomics, 28巻, 84-91頁, 1995年)に対するリガンド活性、例
15 えば、GPR8との結合活性、GPR8発現細胞に対する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等）を有するポリペプチドであれば、いかなるものであってもよく、例
20 えば、WO 01-98494に記載のペプチドなどが用いられる。

GPR8に対するリガンドポリペプチドとしてより具体的には、配列番号：44で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

配列番号：44で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては
25 、例えば、配列番号：45で表されるアミノ酸配列、配列番号：46で表されるアミノ酸配列、配列番号：47で表されるアミノ酸配列、配列番号：48で表されるアミノ酸配列、配列番号：49で表されるアミノ酸配列、および配列番号：50で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

即ち、配列番号：44で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含有するポリペプチドの具体例としては、

- ①配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- ②配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- ③配列番号：46で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- 5 ④配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- ⑤配列番号：48で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- ⑥配列番号：49で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンド、
- ⑦配列番号：50で表されるアミノ酸配列を有するGPR8リガンドなどが用いられる。

10 目的ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

15 本発明の製造法Aにおいて、目的ペプチドのN末端に付加し得る酵素的な切断サイトとしては、例えば、

- (1) タンパク質分解酵素であるエンテロキナーゼの切断サイトであるAsp-Asp-Asp-Lys（配列番号：58）（塩基配列：GATGACGA CGACAAG（配列番号：59）を有するDNAによりコードされる）等、
- (2) タンパク質分解酵素であるファクターXaの切断サイトであるIle-Glu-Gly-Arg（配列番号：60）（塩基配列：ATTGAAGGCCGC（配列番号：61）を有するDNAによりコードされる）等、
- (3) タンパク質分解酵素であるトロンビンの切断サイトであるGly-Pro-Arg（配列番号：62）（塩基配列：GGCCCGCGC（配列番号：63）を有するDNAによりコードされる）等などが挙げられる。

目的ペプチドのN末端に付加し得る化学的な切断サイトとしては、例えば、プロムシアンの切断サイトであるメチオニン残基などが挙げられる。

目的ペプチドのC末端に付加し得る化学的な切断サイトとしては、例えば、シス

テイン残基またはシステイニルペプチドなどが挙げられる。

システイニルペプチドのペプチド部分は、1または2個以上（例えば、1～5個程度）のアミノ酸残基からなる。アミノ酸残基の種類は特に限定されないが、Gly、Ala、Ser、Leuなどが好ましい。また、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なる。さらに、目的ペプチドのN末端にメチオニン残基を付加する場合（プロムシアンを用いる場合）、システイニルペプチドのペプチド部分はメチオニン残基を有しない。

目的ペプチドのN末端およびC末端に酵素または化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質（前駆体ペプチドを含む）とは、目的ペプチドのN末端およびC末端に上記した酵素または化学的な切断サイトが付加されたペプチドが2個以上（例えば、2～100個、好ましくは2～20個程度、より好ましくは2～10個程度）繰り返して連結されたタンパク質である。

本発明の製造法Bにおいて、目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合（プロムシアンを用いる場合）、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質（前駆体ペプチドも含む）とは、前記した目的のペプチドのN末端にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素の切断サイトを有し、C末端にシステイン残基またはシステイニルペプチドを有し、さらに末端にアミノ酸残基を有していてもよいタンパク質を2個以上（例えば、2～100個、好ましくは2～20個程度、より好ましくは2～10個程度）繰り返し連結したものであってもよい。

タンパク質分解酵素切断配列およびシステイニルペプチドは前記と同様である。

本発明の製造法AまたはBで用いられるこれら前駆体タンパク質は、好ましくは、遺伝子工学的手法を用いて製造される組換え型前駆体タンパク質である。

該組換え型前駆体タンパク質は、例えば、後述の前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するベクターを含有する形質転換体を培養して、該前駆体タンパク質を発現させることにより製造することができる。

前駆体タンパク質をコードするDNAは、前記した前駆体タンパク質をコードす

るものであればいかなるものであってもよく、全塩基配列を化学的に合成してもよい。その場合の製造法としては、例えば、公知のホスホアミダイト法、リン酸トリエステル法、ジエステル法、ハイドロジェンホスホネート法などが用いられ、短いものなら一度に、長いものでは分割して合成した後に、T 4 DNAリガーゼを用いて連結して作製することができる。

前駆体タンパク質をコードするDNAを製造するために使用される各目的ペプチドをコードするDNAとしては、公知のDNAを用いることもできるし、公知の方法を用いてクローニングすることができる。DNAの塩基配列は、各目的ペプチドをコードするものであれば、天然型の塩基配列であってもよいし、天然型の塩基配列中のコドンを同一アミノ酸をコードする他のコドンに入れ換えた塩基配列であってもよい。

目的ペプチドのN末端およびC末端に酵素または化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質をコードするDNAは、各目的ペプチドをコードするDNAの塩基配列の5'ー末端および3'ー末端に、酵素または化学的な切断サイトをコードする塩基配列を結合させ、繰り返し配列として構築する。

目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチドを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質をコードするDNAは、各目的ペプチドをコードするDNAの塩基配列の5'ー末端に、ペプチド結合のN末端側の切断反応に用いるプロムシアンまたはタンパク質分解酵素の切断サイトをコードする塩基配列を結合し、さらに各目的ペプチドをコードするDNAの塩基配列の3'ー末端に1ーシアノー4ージメチルアミノピリジウム塩(DMAP-CN)を用いてS-シアノ化反応後、アンモニアリシスあるいは加水分解することにより切断するサイトをコードする塩基配列(例えば、システインをコードするTGTまたはTGC、システイニルペプチドをコードする塩基配列)を結合させ、繰り返し配列として構築する。

また、前駆体タンパク質のC末端はシステイン残基またはシステイニルペプチドの何れであってもよい。

KISS-1ペプチドをコードするDNAとしては、前記したKISS-1ペプチドをコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、例えば、①配列

番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトK i S S - 1ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：3で表される塩基配列を有するDNAが、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するK i S S - 1（45-54）ペプチドをコードする塩基配列としては、配列番号：4で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、コドンを同一アミノ酸をコードする他のコドンに適宜入れ換えてよい。

本発明の方法において用いられるK i S S - 1ペプチドをコードするDNA含有するDNAの具体例としては、例えば、

GGTAGCGCGA TGTATAACTG GAACAGCTT GGTCTGCGTT TTTGTGGCTC GGCGATGTAC
10 AATTGGAATT CCTTCGGCCT GCGCTTCTGC GGCTCGGCGA TGTATAACTG GAACTCCCTT
GGCCTGCGCT TTTGCGGTTC TGCT

で表される塩基配列（配列番号：5）を含有するDNAなどが挙げられる。この塩基配列は、K i S S - 1ペプチド（45-54）をコードする配列番号：4で表される塩基配列の5'-末端にプロムシアンの切断サイトをコードする塩基配列（AT 15 G）が結合し、さらにその3'-末端に1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩（D MAP-CN）の切断サイトをコードする塩基配列（TGT）が結合したものである。この塩基配列を繰り返し連結することにより、K i S S - 1ペプチドの前駆体タンパク質をコードするDNAを製造することができる。

R F R P - 1をコードするDNAとしては、前記したR F R P - 1をコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、例えば、①配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するR F R P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：1 2で表される塩基配列を有するDNAが、②配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するR F R P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：1 3で表される塩基配列を有するDNAが、③配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有するR F R 25 P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：1 4で表される塩基配列を有するDNAが、④配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するR F R P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：1 5で表される塩基配列を有するDNAが、⑤配列番号：1 0で表されるアミノ酸配列を有するR F R P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：1 6で表される塩基配列を有するDNAが、⑥配列番号：1 1

で表されるアミノ酸配列を有するR F R P - 1をコードするDNAとしては、配列番号：17で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

アペリンをコードするDNAとしては、前記したアペリンをコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、例えば、①配列番号：18で表されるアミノ酸配列を有するアペリン18をコードするDNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

P r R PをコードするDNAとしては、前記したP r R PをコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、具体的には、WO 97-24436号に記載のDNAが用いられる。

10 G A L PをコードするDNAとしては、前記したG A L PをコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、具体的には、WO 99/48920に記載のDNAが用いられる。

G P R 8リガンドをコードするDNAとしては、前記したG P R 8リガンドをコードするDNAであれば如何なるものであってもよいが、具体的には。①配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表される塩基配列を有するDNAが、②配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：52で表される塩基配列を有するDNAが、③配列番号：46で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：53で表される塩基配列を有するDNAが、④配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：54で表される塩基配列を有するDNAが、⑤配列番号：48で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：55で表される塩基配列を有するDNAが、⑥配列番号：49で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：56で表される塩基配列を有するDNAが、⑦配列番号：50で表されるアミノ酸配列を有するG P R 8リガンドをコードするDNAとしては、配列番号：57で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の方法において用いられるG P R 8リガンドをコードするDNA含有す

るDNAの具体例としては、例えば、

GATGACGATG ACAAAATGGTA TAAACATGTG GCGAGCCCGC GTTATCATAC CGTGGGCCGC GCGGCCG
GTC TGCTGATGGG CCTGTGTCAA TTGGGTGGTG ATGACGATGA CAAATGGTAT AAACATGTGG CGA
5 GCGCCGCG TTATCATACC GTGGGCCGCG CGGCCGGTCT GCTGATGGGC CTGTGTGAGC TCGGCTCTGA
CGACGATGAT AAATGGTACA AACACGTTGC CTCCCCGCGC TACCACACGG TTGGTCGTGC CGCGGG
CCTG CTGATGGGTC TGTGCGGT

で表される塩基配列（配列番号：64）を含有するDNAなどが挙げられる。この塩基配列は、G P R 8リガンド（23残基）をコードする配列番号：44で表される塩基配列の5'-末端にエンテロキナーゼ切断配列（A s p - A s p - A s p - A
10 s p - L y s ; 配列番号：58）をコードする塩基配列（配列番号：59）が結合し、さらにその3'-末端に1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩（DMA P-CN）の切断サイトをコードする塩基配列（T G T）が結合したものである。この塩基配列を繰り返し連結することにより、G P R 8リガンド（23残基）の前駆体タンパク質をコードするDNAを製造することができる。

15 また、目的ペプチドを繰り返し連結した前駆体タンパク質をコードするDNAを、従来の遺伝子技術、例えば部位特異的突然変異誘発技術を用いて目的ペプチドのムテインをコードするDNAに変換することができる。

部位特異的突然変異誘発技術は公知であり、アール・エフ・レイサー (Lather, R. F.) 及びジェイ・ピー・レコック (Lecoq, J. P.)、ジェネティック・エンジニアリング (Genetic Engineering)、アカデミックプレス社 (1983年) 第31-50頁などに示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発は、エム・スミス (Smith, M.) 及びエス・ギラム (Gillam, S.)、ジェネティック・エンジニアリング：原理と方法、プレナム出版社 (1981年) 3巻 1-32頁などに示されている。

25 前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するベクターとして用いられるプラスミドとしては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のpBR322 [ジーン (Gene), 2, 95 (1977)], pBR313 [ジーン, 2, 75 (1977)], pBR324, pBR325 [ジーン, 4, 124 (1978)], pBR327, pBR328 [ジーン, 9, 287 (1980)], pBR329 [ジーン, 17,

79(1982)] , pKY2289 [ジーン, 3, 1(1978)] , pKY 270
0 [生化学, 52, 770(1980)] , pACYC177, pACYC184 [ジ
ヤーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology), 134, 114
1(1978)] , pRK248, pRK646, pDF [メソッズ・イン・エンジ
5 モロジー (Methods in Enzymology), 68, 268(1979)] , pUC18, p
UC19 [ヤニシューペロンら, ジーン(Gene), 33, 103(1985)] などが
挙げられる。

また、バクテリオファージ、例えば λ ファージを使用した λ gt系の λ gt・ λ C [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 4579(1974)] , λ t・ λ B [Pro
10 c. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3461(1975)] , λ Dam [ジーン,
1, 255(1977)] やシャロンベクター [サイエンス, (Science), 196,
161(1977) ; ジャーナル・オブ・ビロロジー (Journal of Virology), 2
9, 555(1979)] , 繊維状ファージを使用したmp系のmp18, mp19 [ヤニ
15 シューペロンら, ジーン(Gene), 33, 103(1985)] ベクターなども挙げら
れる。

上記DNAは、ATGの上流にプロモーターを有しているのが好ましく、該プロ
モーターは、形質転換体の製造に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであれ
ばいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌 (*Escherichia coli*) の場合、trp
20 プロモーター, lacプロモーター, rec Aプロモーター, λ PLプロモーター, lpp
プロモーター, T7プロモーターなどが用いられる。

T7プロモーターの系を用いる場合には、T7プロモーターとしては、T7DN
A上で見い出されている17種のプロモーター [J. L. Oakley ら, Proc. Natl. A
cad. Sci., U. S. A., 74:4266-4270(1977), M. D. Rosa, Cell
16:815-825(1979), N. Panayotatos ら, Nature, 280:35(1
25 979), J. J. Dunn ら, J. Mol. Biol., 166:477-535(1983)]
のいずれでもよいが ϕ 10プロモーター [A. H. Rosenberg ら, Gene, 56:12
5-135(1987)] が好ましい。

転写ターミネーターとしては、大腸菌の系で作動するターミネーター、好ましく
はT ϕ ターミネーター [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol. 189:113-13

0 (1986)] などが用いられる。

T7 RNAポリメラーゼDNAとしては、T7 DNA [F. W. Studierら, J. Mol. Biol., 189: 113-130 (1986)] などが用いられる。

ベクターは上記ベクターにT7プロモーター, T7ターミネーターを組み込んで構築されるのが好ましく、このようなベクターとしては、pET-1, pET-2, pET-3, pET-4, pET-5 [A. H. Rosenberg, Gene 56: 125-135 (1987)], pTB960-2 [EP-A-499990] などが用いられ、好ましくはpTB960-2が用いられる。

形質転換体は、上記方法で得られる発現用プラスミドを公知の方法〔例、コーンS, N, ら, プロシージング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 69, 2110 (1972)〕で宿主を形質転換することにより製造することができる。

形質転換される微生物の宿主としては、例えば、エシェリヒア(Escherichia)属菌などが挙げられる。

上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア・コリ(E. coli)が挙げられ、具体的にはエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)K12 DH1 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 60, 160 (1968)], JM-103 [ヌクレオイック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)], JA 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)], N4830 [セル(Cell), 25, 713 (1981)], K-12 MM294 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ, 73, 4174 (1976)] BL-21などが用いられる。

T7プロモーターの系を用いる場合には、その形質転換体の宿主としては、T7 RNAポリメラーゼDNA(T7 DNA 1) [F. W. Studierら, J. Mol. Biol. 189: 113-130 (1986)] を組み込んだ大腸菌株(例えば、MM294,

DH-1, C600, JM109, BL21)、T7 RNAポリメラーゼDNA (T7 DNA 1)を他のプラスミドと共に組込んだ大腸菌株などが用いられる。好ましくはT7 DNA 1を組み込んだフージが溶原化したMM294株およびBL21株が用いられる。この場合T7 DNA 1のプロモーターとしては、イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド (IPTGと略することがある。)で発現が誘導されるlacプロモーターが用いられる。

組換え型前駆体タンパク質は、上述の形質転換体を培地に培養し、產生された組換え型前駆体タンパク質を採取することにより製造することができる。

培地のpHは約6～8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3 β -インドリル アクリル酸やイソプロピル β D-チオガラクトピラノシドのような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

T7プロモーターの系を用いている場合には、(1) lacプロモーターの下流に連結されているT7 DNA (RNAポリメラーゼDNA) を発現させる時はIPTGなどを添加する、もしくは(2) λ PLプロモーターの下流に連結されているT7 DNA (RNAポリメラーゼDNA) を発現させる時は培養の温度を上昇させることなどにより、生成するT7フージRNAポリメラーゼ1により特異的にT7プロモーターを作動させる。

培養後、公知の方法で菌体を集め、例えば緩衝液に懸濁したのち、例えば、蛋白変性剤処理、超音波処理やリゾチームなどの酵素処理、グラスビーズ処理、フレンチプレス処理、凍結融解処理などを行って菌体を破碎し、遠心分離など公知の方法によって封入体あるいは可溶体（上清）を取得するが、封入体として取得するほうが望ましい。

上記により得られた封入体は変性剤を用いて可溶化し、次の反応工程に進んでも

よい。上清から組換え型前駆体タンパク質を単離するには、通常知られているタンパク質の精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、電気泳動等を適切に組み合せて行うことができる。また、該前駆体タンパク質は、精製することなく、あるいは部分精製の状態で、次の反応工程に進んでもよい。

上記のようにして得られた組換え型前駆体タンパク質中の各目的ペプチドのN末端側の切断反応には、プロムシアンまたはタンパク質分解酵素などが用いられる。

10 タンパク質分解酵素としては、タンパク質分解酵素として知られているものであれば何れでもよいが、例えば、エンテロキナーゼ、ファクターX a、トロンビンなどが好ましく、特にエンテロキナーゼやファクターX aなどが好ましく用いられる。

15 組換え型ポリペプチド 1 mgあたりタンパク質分解酵素の使用量は、通常約 0.01 ユニットから約 100 ユニット、好ましくは約 0.1 ユニットから約 10 ユニットである。

20 該切断反応にプロムシアンを用いる場合、組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドのN末端にプロムシアン切断サイトであるメチオニン残基を連結する。また、この場合、目的ペプチドはメチオニン残基を有さないものであることが好ましい。

25 タンパク質分解酵素としてエンテロキナーゼを用いる場合には、組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドのN末端にエントロキナーゼ切断サイトを示す配列 (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys；配列番号：54) 等を連結する。また、この場合、目的ペプチドは Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 等で表されるアミノ酸配列を有さないものであることが好ましい。

タンパク質分解酵素としてファクターX aを用いる場合には、組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドのN末端にファクターX a 切断サイトを示す配列 (Ile-Glu-Gly-Arg；配列番号：56) 等を連結する。また、この場合、目的ペプチドは Ile-Glu-Gly-Arg 等で表されるアミノ酸配列を有

さないものであることが好ましい。

タンパク質分解酵素としてトロンピンを用いる場合には、組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドのN末端にトロンピン切断サイトを示す配列 (G l y - P r o - A r g ; 配列番号 : 5 8) 等を連結する。また、この場合、目的ペプチドは G 5 l y - P r o - A r g 等で表されるアミノ酸配列を有さないものであることが好ましい。

タンパク質分解酵素によるペプチド結合の切断反応の反応温度は、通常約 0 ℃ ~ 約 6 0 ℃ であり、好ましくは約 0 ℃ ~ 約 4 0 ℃ である。

用いる溶媒としては、特に限定はされないが、例えば、トリス - 塩酸緩衝液、トリス - 酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などが挙げられる。

該反応における pH は、通常約 1 ~ 約 1 2 、好ましくは約 4 ~ 約 8 である。

組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドの C 末端側の切断反応は、例えば E P 8 8 7 4 1 7 に記載されている方法を用いて行うことができる。すなわち、組換え型前駆体タンパク質中の目的ペプチドの C 末端側のシスティンの N 末端側で切断反応に付す。

該切断反応としては、例えば、S - シアノ化反応次いで加水分解反応が挙げられる。目的ペプチドのアミドまたはその塩を最終物として得る場合には、該切断反応としては、例えば、S - シアノ化反応次いでアンモノリシスを行うことがあげられる。該 S - シアノ化反応は、原料化合物に、S - シアノ化試薬を作用させることにより行なう。

S - シアノ化試薬としては、例えば、2 - ニトロー - 5 - チオシアノ安息香酸 (N T C B) , 1 - シアノ - 4 - ジメチルアミノピリジウム塩 (D M A P - C N) , C N - イオンなどが挙げられる。

該 S - シアノ化試薬の量は、モル数で全チオール基の約 2 倍から 5 0 倍量であればよく、好ましくは約 5 倍 ~ 1 0 倍量である。

反応温度は約 0 ℃ ~ 8 0 ℃ の間であれば、いずれでもよく、約 0 ℃ ~ 5 0 ℃ の間がより好ましい。用いる溶媒としては、S - シアノ化試薬と反応しないものであれば、いずれの緩衝液でもよいが、例えば、トリス - 塩酸緩衝液、トリス - 酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、などがあげられる。また、有機溶媒は、S - シ

アノ化試薬と反応しないものであれば、存在していてもよい。

該反応は、pH 1～12の間で行なうのが良い。特に、NTCBを用いる場合にはpH 7～10、DMAP-CNを用いる場合にはS-S交換反応を防止するため、pH 2～7の間が好ましい。また、反応液中には、塩酸グアニジン等の変性剤が存在していてもよい。

上記アンモノリシスまたは加水分解反応としては、例えばアルカリ処理に付すことが挙げられる。

該アルカリ処理としては、原料化合物を含有する水溶液のpHを7～14に、調整することにより行なわれる。

該pHの調整は、例えばアンモニア、水酸化ナトリウム、アミノ化合物、トリツマベース（トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン）、リン酸第2ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム等の溶液を原料化合物を含有する水溶液に適当量加えて行うが特にアンモニアなどが好ましい。

上記反応の際の溶液の濃度としては、たとえばアンモニアまたはアミノ化合物の場合は約0.01～1.5N好ましくは約0.1～3N、水酸化ナトリウムの場合は約0.01～2N好ましくは約0.05～1N、トリツマベースの場合は約1mM～1M好ましくは約20mM～200mM、リン酸第2ナトリウムの場合は約1mM～1M好ましくは約10mM～100mM、水酸化カリウムの場合は約0.01～4N好ましくは約0.1～2Nがあげられる。反応温度は約-20℃～80℃の間であればいざれでもよく、約-10℃～50℃の間がより好ましい。

反応時間は、好ましくは、S-シアノ化反応は約1～60分好ましくは約15～30分が、加水分解反応は約5分～100時間好ましくは10分～15時間が、アンモノリシスは約5分～24時間好ましくは約10～180分があげられる。

該アミノ化合物としては、例えば、式 $R^1-(NR^2)-H$ (式中、 R^1 および R^2 は同一または異なって、(i) 水素原子、(ii) C_{1-20} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール(aryl)基または C_{6-14} アリール-C₁₋₃アルキル基（これらは置換基を有していないかあるいは1～3個のアミノ基、水酸基などを炭素原子上有しているてもよい）、(iii) 置換されていてもよいアミノ基、(iv) 水酸基または C_{1-6} アルコキシ基を示す。) で表される化合物などが挙げられる。

該切断反応により切り出される目的ペプチドを単離するには、通常知られているペプチドの精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、電気泳動等を適宜組み合せて行うことができる。

また、該目的ペプチドは、必要によりこれを凍結乾燥により粉末とすることもできる。凍結乾燥に際しては、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、マルトース、トレハロース、グリセロールなどの安定化剤を加えることができる。

本発明の製造法で得られた目的ペプチドのC末端は、アミド ($-\text{CONH}_2$)、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、アルキルアミド ($-\text{CONHR}$) またはエステル ($-\text{COOR}$) であってもよい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明の製造法で得られた目的ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩は、滅菌水、ヒト血清アルブミン(HSA)、生理食塩水その他公知の生理学的に許容される担体と混合することができ、安全な医薬として、哺乳動物(例、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ラット、マウス、モルモットなど)に対して非経口的に又は局所に投与することができる。例えば、その1日投与量は、1人あたり約0.01mg～約50mg、好ましくは約0.1mg～約10mgを静注または筋注などにより非経口的に投与することができる。

本発明の目的ペプチドを含有する製剤は、塩、希釈剤、アジュvant、他の担体、バッファー、結合剤、界面活性剤、保存剤のような生理的に許容される他の活性成分も含有していてもよい。非経口的投与製剤は、滅菌水溶液又は生理学的に許容される溶媒との懸濁液アンプル、または生理学的に許容される希釈液で用時希釈して使用しうる滅菌粉末(通常ペプチド溶液を凍結乾燥して得られる)アンプルとし

て提供される。

本明細書および図面において、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基、その他に
関し略号で表示する場合、それらは IUPAC-IUB (Commission on Biochemical
5 Nomenclature)による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくもので
あり、その例を次にあげる。また、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合
は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
A	: アデニン
10 T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
15 Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
20 Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
25 Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニールアラニン
Tyr	: チロシン

Trp	:トリプトファン
Pro	:プロリン
Asn	:アスパラギン
Gln	:グルタミン
5 ATP	:アデノシン三リン酸
T7P	:T7プロモーター
T7T	:T7ターミネーター

本願明細書の配列番号は、以下のものを示す。

10 [配列番号：1]

ヒトK i S S - 1ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

ヒトK i S S - 1 (45-54) ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

15 配列番号：1で表されるヒトK i S S - 1ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

配列番号：2で表されるヒトK i S S - 1 (45-54) ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：5]

ヒトK i S S - 1 (45-54) ペプチドの前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：6]

9アミノ酸残基からなるR F R P - 1のアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：7]

12アミノ酸残基からなるR F R P - 1のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：8]

20アミノ酸残基からなるR F R P - 1のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：9]

37アミノ酸残基からなるR F R P - 1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：10]

9アミノ酸残基からなるR F R P - 1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：11]

5 17アミノ酸残基からなるR F R P - 1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

配列番号：6のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：13]

10 配列番号：7のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：14]

配列番号：8のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

15 [配列番号：15]

配列番号：9のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：16]

配列番号：10のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：17]

配列番号：11のアミノ酸配列で表されるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

25 アペリン-36のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：19]

アペリン-36をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

ウシP r R Pのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：21]

ラットPrRPのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：22]

ヒトPrRPのアミノ酸配列を示す。

5 [配列番号：23]

配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同一なペプチドの具体例を示す。

[配列番号：24]

WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製し、P-3画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。

[配列番号：25]

WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製、P-2画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。

[配列番号：26]

15 WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：27]

WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号：28]

WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：29]

25 WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：30]

WO 97-24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：31]

WO 97/24436に記載のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：32]

WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列
5 を示す。

[配列番号：33]

WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：34]

10 WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：35]

WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

15 [配列番号：36]

WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：37]

20 WO 97/24436に記載のラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：38]

WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：39]

25 WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：40]

WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 1]

WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 2]

5 WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 3]

WO 97/24436に記載のヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 [配列番号：4 4]

GPR8に対するリガンドポリペプチド（ヒト型・1-23）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 5]

15 GPR8に対するリガンドポリペプチド（ブタ型・1-23）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 6]

GPR8に対するリガンドポリペプチド（ラット・マウス型・1-23）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 7]

20 GPR8に対するリガンドポリペプチド（ヒト型・1-30）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4 8]

GPR8に対するリガンドポリペプチド（ブタ型・1-30）のアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：4 9]

GPR8に対するリガンドポリペプチド（ラット型・1-30）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：5 0]

GPR8に対するリガンドポリペプチド（マウス型・1-30）のアミノ酸配列

を示す。

[配列番号：5 1]

G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ヒト型・1－2 3）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

5 [配列番号：5 2]

G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ブタ型・1－2 3）をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：5 3]

10 G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ラット・マウス型・1－2 3）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：5 4]

G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ヒト型・1－3 0）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：5 5]

15 G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ブタ型・1－3 0）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：5 6]

G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（ラット型・1－3 0）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

20 [配列番号：5 7]

G P R 8 に対するリガンドポリペプチド（マウス型・1－3 0）をコードするD N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：5 8]

エンテロキナーゼ切断配列を表すアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：5 9]

エンテロキナーゼ切断配列をコードするD N Aの塩基配列を示す。

[配列番号：6 0]

ファクターX a 切断配列を表すアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6 1]

ファクターX a 切断配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：6 2]

トロンビン切断配列を表すアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6 3]

5 トロンビン切断配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：6 4]

ヒトG P R 8リガンド（配列番号：4 4）の前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：6 5]

10 実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：6 6]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：6 7]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：6 8]

20 実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：6 9]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：7 0]

25 実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：7 1]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：72]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：73]

5 実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：74]

実施例1において構造遺伝子の製造に用いたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

10

以下の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCGPR3は、平成14(2002)年4月17日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8023として、平成14(2002)年3月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16773として寄託されている。

実施例

20 以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

(a) ヒトGPR8リガンド (hGPR8L; 配列番号：44) を3回タンデムにコードする遺伝子の製造

以下に示す10種のDNA断片(配列表中、配列番号：65～74)を用いてhGPR8Lを3回タンデムにコードする構造遺伝子を調製した。

#1

5'-TATGGATGACGATGACAAATGGTATAAACATGTGGCGAGCCCGCGTTATCATAACCG

(配列番号：65)

#2

5'-GCGCGGCCACGGTATGATAACGCGGCTGCCACATGTTATACCATTGTATCGTCATCCA

(配列番号：66)

5 #3

5'-TGGGCCGCGCGGCCGGTCTGCTGATGGGCCTGTGTCAATTGGTTGAACCTCTGTCTCCGC

CGCCGGAG (配列番号：67)

#4

5'-GATCCTCCGGCGGCCGGAGACAGAGAAGTTCAAACCAATTGACACAGGCCATCAGCAGACCGGCC

10 (配列番号：68)

#5

5'-AATTGGGTGGTGATGACGATGACAAATGGTATAAACATGTGGCGAGCCCCGGTTATCATACCG

(配列番号：69)

#6

15 5'-CGGCCCACGGTATGATAACGCGGCTGCCACATGTTATACCATTGTATCGTCATCACCAACCC

(配列番号：70)

#7

5'-TGGGCCGCGCGGCCGGTCTGCTGATGGGCCTGTGTGAGCTGGCTCTGACGACGATGATAATGGT

AC (配列番号：71)

20 #8

5'-CAACGTGTTGTACCATTTATCATCGTCGTACAGAGCCGAGCTCACACAGGCCATCAGCAGACCGG

CC (配列番号：72)

#9

5'-AAACACGTGCTCCCCGCGTACACACGGTTGGTCGTGCCGCCCTGCTGATGGGTCTGTGC

25 GGTTGAG (配列番号：73)

#10

5'-GATCCTCAACCGCACAGACCCATCAGCAGGCCCGCGCACGACCAACCGTGTGGTAGCGCGGGGAG

G (配列番号：74)

#2および#3のDNAオリゴマー各々を、25 μlのリン酸化反応液 [DNAオ

リゴマー $10\ \mu g$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM スペルミジン, 10 mM ジチオスレイトール（以後DTTと略記）, 0.1 mg/mlウシ血清アルブミン（以後BSAと略記）, 1 mM ATP, 10 ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）] 中で37°C・1時間反応させ、各オリゴマーの5'末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2倍量のエタノールを加え、-70°Cに冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

上記で得られたDNAフラグメントと#1および#4を合わせ $120\ \mu l$ とした。この混合液を90°Cで10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液 $30\ \mu l$ にII液 $30\ \mu l$ を加えよく混合した後、I液 $60\ \mu l$ を加え、16°C、1時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70°Cに冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。この様にして得られたDNAフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行い、構造遺伝子を作成した。

発現用ベクターとしてはpTC II (WO 00/20643) をNde IおよびBamHI（宝酒造）で37°C、4時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.4kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、 $25\ \mu l$ のTE緩衝液に溶解した。このpTC IIのNde I、BamHI断片と上記により調製した構造遺伝子をTaKaRa DNA ligation kit ver. 2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液 $10\ \mu l$ 用いて大腸菌JM109コンピテントセル（東洋紡）に形質転換し、 $10\ \mu g/ml$ のテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37°Cで1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドpTCGPR1を調製した。このpTC GPR1をMun IおよびBamHI（宝酒造）で37°C、4時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.5kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、 $25\ \mu l$ のTE緩衝液に溶解した。

#6、#7、#8、#9のDNAオリゴマー各々を、 $25\ \mu l$ のリン酸化反応液 [DNAオリゴマー $10\ \mu g$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1

mMスペルミジン、10 mM DTT、0.1 mg/ml BSA、1 mM ATP、10 ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)】中で37℃、1時間反応させ、各オリゴマーの5'末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。このDNA
5 フラグメントと#5および#10を合わせ120 μlとした。この混合液を90℃で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2(宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30 μlにII液30 μlを加えよく混合した後、I液60 μlを加え、37℃、1時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し
10 2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。この様にして得られたDNAフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)によるリン酸化を行った。この構造遺伝子部分とpCTGPR1のMun I、BamH I断片をTaKaRa DNA ligation kit ver. 2(宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を10 μl用いて大腸菌JM109コンピテントセル
15 (東洋紡)に形質転換し、10 μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit(キアゲン社)を用いてプラスミドpCTGPR3を調製した。このpCTGPR3の前駆体タンパク質構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377
20 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpCTGPR3を大腸菌MM294(DE3)に形質転換し、前駆体タンパク質の発現株MM294(DE3)/pCTGPR3を得た。

(b) 前駆体タンパク質の製造

MM294(DE3)/pCTGPR3を10 mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地に30 ml(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)を用いて200 ml容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液15 mlを300 mlの主発酵培地(1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.025%硫酸マグネシウム、0.00025%、塩酸チアミン、1.5%ブド

ウ糖、1.5%カザミノ酸)を仕込んだ1000ml容フラスコへ移植して、37℃で振とう培養を開始した。培養液の濁度が150クレット単位になったところで、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が10mg/Lになるように添加し、さらに3時間培養を行った。培養終了後、培養液(300ml)

5 を遠心分離し、約2gの湿菌体を取得した。

実施例2

実施例1で得た菌体2gに10mM EDTA(pH6.0)10mlを加え、超音波処理(BRANSON SONIFIER MODEL 450)をした後、

10 遠心分離(15000rpm、15分)を行った。沈殿物を再び同様の操作を行った。沈殿物に7Mグアニジン溶液5ml(pH5.0)を加えて2時間攪拌した後、遠心分離(15000rpm、15分)を行った。上澄液にTris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride(TCEP-HCl)17mgを添加し、50℃、10分で還元処理を行った後、0.1%TFAで平衡化したC4P-50(1cm×25cm、昭和電工)に通液し、吸着、洗浄した後、20-60%B(B:80%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)の段階勾配を2ml/分の流速で溶出を行い、前駆体タンパク質画分(溶出時間約27分)をプールした後、凍結乾燥を行い、前駆体タンパク質の凍結乾燥粉末を得た。

20 実施例3

実施例2で得た前駆体凍結乾燥粉末を、0.1M酢酸、6M尿素溶液1mlで溶解した後、DMAP-CNを3.5mg添加し、25℃で15分間反応した。反応終了後、0.1%TFAで平衡化したC4P-50(1cm×25cm、昭和電工)に通液し、吸着、洗浄した後、20-60%B(B:80%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)の段階勾配を2ml/分の流速で溶出を行い、S-シアノ化された前駆体タンパク質画分(溶出時間約27分)をプールした後、凍結乾燥を行い、S-シアノ化された前駆体タンパク質の凍結乾燥粉末を得た。この凍結乾燥粉末を6M尿素0.8mlで溶解した後、1N苛性ソーダ溶液0.2mlを添加し、0℃で15分間反応した。反応終了後、酢酸でpH7.4に調製した。この

切斷反応液に 9 ml の 50 mM NaCL、2 mM CaCL₂、20 mM トリス／HCL (pH 7.4) 溶液を加えた後、エンテロキナーゼ (Novagen 社) 1 単位を加え、25°Cで 20 時間反応した。反応終了後、0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (1 cm × 25 cm、昭和电工) に通液し、吸着、洗浄した後、20–60% B (B: 80% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸) の段階勾配を 2 ml / 分の流速で溶出を行い、hGPR8 L 画分 (溶出時間約 22 分) をプールした後、凍結乾燥を行い、hGPR8 L 凍結乾燥粉末約 70 μg を得た。

10 実施例 4 (hGPR8 L の特徴の決定)

a) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (PE アプライドバイオシステムズ モデル 491) を用いて決定した。その結果、hGPR8 L の DNA 塩基配列から予想される N 末端アミノ酸配列と一致した (表 1)。

15

〔表 1〕

N末端アミノ酸配列

20 残基 No.	検出された PTH-アミノ酸 ¹⁾	hGPR8 リガンド の塩基配列	
		から予測されるアミノ酸	
1	Trp	Trp	
2	Tyr	Tyr	
3	Lys	Lys	
25 4	His	His	
5	Val	Val	
6	Ala	Ala	
7	Ser	Ser	
8	Pro	Pro	

9	A r g	A r g
10	T y r	T y r

1) フェニールチオヒダントイン
 5 b) 質量分析
 得られたh G P R 8 Lの質量分析を行い、測定結果は2583.7Da（理論値：2584.0）
 となつた。
 c) 活性
 WO 01/98494号記載の実施例6と同様の方法を用いて、G P R 8 発現C
 10 HO細胞の膜画分を用いたG T P γ S結合活性の測定を行い、化学合成品と同等で
 ある事を確認した。

実施例5 大腸菌でのK i S S - 1ペプチド前駆体タンパク質発現プラスミドの構築

15 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の35番目から54番目に相当するK i
 S S - 1（35-54）ペプチドの前駆体蛋白発現プラスミドは下記の通り構築す
 る。
 実施例1に記載した方法と同様に10種のDNA断片を用いてK i S S - 1（3
 5-54）ペプチドを3回タンデムにコードする構造遺伝子を調製する。この構造
 20 遺伝子をp T C I IベクターのN d e IおよびB a m H I断片と上記の構造遺伝
 子をTaKaRa DNA ligation kit ver. 2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行
 う。この反応液を10 μ l用いて大腸菌J M 1 0 9コンピテントセル（東洋紡）を
 形質転換し、10 μ g/m lのテトラサイクリンを含むL B寒天培地上に播き、3
 7°Cで1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選ぶ。この形質転換体を
 25 L B培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キヤゲン社）を用いてプラスミ
 ドpTCKiSS3554を調製する。このポリペプチドDNAの塩基配列をアプライドバイ
 オシステムズ社モデル377DNAシーケンサーを用いて確認する。プラスミドp
 TCKiSS3554を大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i）MM294
 （DE 3）に形質転換し、前駆体タンパク質発現株E s c h e r i c h i a c o

1 i MM294 (DE3) / pTCKiSS3554を得る。

実施例6 前駆体タンパク質の製造

実施例5のEscherichia coli MM294 (DE3) / pTCKiSS3554を5. 0 mg/Lのテト
5 ラサイクリンを含むLB培地・1 L (1 %ペプトン、0. 5 %酵母エキス、0. 5
%塩化ナトリウム) を用いて2 L容フラスコ中で37°C、8時間振とう培養した。
得られた培養液を19 Lの主発酵培地 (1. 68 %リン酸1水素ナトリウム、0.
10 3 %リン酸2水素カリウム、0. 1 %塩化アンモニウム、0. 05 %塩化ナトリウ
ム、0. 05 %硫酸マグネシウム、0. 02 %消泡剤、0. 00025 %硫酸第1
鉄、0. 0005 %塩酸チアミン、1. 5 %ブドウ糖、1. 5 %ハイケースアミノ
) を仕込んだ50 L容発酵槽へ移植し、30°Cで通気攪拌を開始する。培養液の濁
度が500 クレット単位になったところで、イソプロピル-β-D-チオガラクト
ピラノシドの最終濃度が10mg/Lになるように添加し、さらに4時間培養を行う。
培養終了後、培養液を遠心分離し、湿菌体を取得し、-80°Cで保存する。

15

実施例7 K i S S - 1 (35-54) の取得

実施例6で得られる菌体100 gに10mM EDTA (pH6) 200mLを加え、超音波処理 (B
RANSON SONIFIER MODEL 450) した後、遠心分離 (10000r
pm、60分) を行う。沈殿物に再び同様の操作を行う。沈殿物に0. 1M酢酸、8 M尿
20 素溶液50mLを加えて2時間攪拌し、遠心分離 (10000rpm、60分) を行う。上澄液
に、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウム塩 (DMAP-CN) 200mg
を加え、室温で15分間反応する。反応終了後、反応液を10%酢酸で平衡化した
Sephadex G-25カラム (46mmID×600mmL、ファルマシア) に通液し、平
衡化に用いた10%酢酸を6mL/minの流速で展開し、S-シアノ化されたポ
25 リペプチドを得る。この溶出液をペリコンミニカセット (ミリポア社) で濃縮・脱
塩を行い、最終濃度6Mとなるように尿素を添加し、さらに、3M濃度となるよう
に25%アンモニア水を加え、15°Cで15分間反応させる。反応終了後、酢酸で
pH 6. 0に調整する。この反応液を0. 1%トリフルオロ酢酸 (TFA) で平衡化
したODS-120T (21. 5mm×300mm、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、20

—60% B (B : 80% アセトニトリル / 0.1% TFA) の段階勾配で溶出を行い、C末端がアミド化されたペプチド画分をプールし、この画分を凍結乾燥し、ペプチドの凍結乾燥粉末を得る。このペプチドを 10m l の 70% ギ酸溶液で溶解し、プロムシアン 10mg を添加し 24 時間、室温で反応する。反応終了後、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) で平衡化した ODS-120T (21.5mm × 300mm、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、20—60% B (B : 80% アセトニトリル / 0.1% TFA) の段階勾配で溶出を行い、K i S S - 1 (35—54) 画分をプールし、凍結乾燥を行い K i S S - 1 (35—54) の凍結乾燥粉末を得る。

10 実施例 8 K i S S - 1 (45—54) の製造

実施例 1 に記載の方法に従い、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の 45 番目より 54 番目に相当する K i S S - 1 (45—54) ペプチドの前駆体蛋白発現プラスミド pTCK i S S 4554 を構築する。このプラスミドは K i S S - 1 (45—54) を 9 回タンデムにコードする構造遺伝子を有する。プラスミド pTCK i S S 4554 を大腸菌 (Escherichia coli) MM294 (DE3) に形質転換し、前駆体タンパク質発現株 Escherichia coli MM294 (DE3) / pTCK i S S 4554 を得る。この発現株の培養を行い、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドによる発現誘導後の菌体より、実施例 6 と同様にして K i S S - 1 (45—54) を得る。

20

産業上の利用の可能性

右手用はさみ (S-シアノ化反応) と左手用はさみ (プロムシアン処理、エンテロキナーゼ、ファクター Xa 処理等) による目的ペプチドの切り出しとタンデムリピート法とを組み合わせた本発明の方法は、遺伝子組換え技術によるペプチド、特に、
25 低分子量のペプチドの大量合成に有用である。

請求の範囲

1. 目的ペプチドのN末端およびC末端に酵素または化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質を酵素または化学的に切断することを特徴とする目的ペプチドまたはその塩の製造法。
2. 目的ペプチドのN末端に酵素または化学的な切断サイトを、C末端に化学的な切断サイトを付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質を酵素または化学的に切断することを特徴とする請求項1記載の製造法。
3. 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質中の各目的ペプチドのN末端側をプロムシアンまたはタンパク質分解酵素で切断し、C末端側のシステインまたはシステイニルペプチドのN末端側で切断反応に付することを特徴とする目的ペプチドまたはその塩の製造法。
4. 前駆体タンパク質が組換え型前駆体タンパク質である請求項1～3記載の製造法。
5. 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である請求項3記載の製造法。
6. S-シアノ化反応を2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩(DMAP-CN)またはCN⁻イオンの存在下で行う請求項5記載の製造法。
7. タンパク質分解酵素がエンテロキナーゼ、ファクターXaまたはトロンビンである請求項3記載の製造法。
8. (1) プロムシアンを用いる場合、各目的ペプチドのN末端にメチオニン残基を連結し、目的ペプチドがメチオニン残基を有さない、
(2) タンパク質分解酵素がエンテロキナーゼである場合、各目的ペプチドのN末端にAsp-Asp-Asp-Asp-Lysを連結し、目的ペプチドがAsp-

A s p - A s p - A s p - L y s で表されるアミノ酸配列を有さない、

(3) タンパク質分解酵素がファクターXaである場合、各目的ペプチドのN末端に I l e - G l u - G l y - A r g を連結し、目的ペプチドが I l e - G l u - G l y - A r g で表されるアミノ酸配列を有さない、

5 (4) タンパク質分解酵素がトロンビンの場合、各目的ペプチドのN末端に G l y - P r o - A r g を連結し、目的ペプチドが G l y - P r o - A r g で表されるアミノ酸配列を有さない請求項3記載の製造法。

9. 目的ペプチドが K i S S - 1 ペプチドである請求項1～3記載の製造法。

10. 目的ペプチドが G P R 8 リガンドである請求項1～3記載の製造法。

10 11. G P R 8 リガンドのN末端側にエンテロキナーゼ切断配列を、C末端側にシステイン残基を付加して3回繰り返し連結した前駆体タンパク質中の各G P R 8 リガンドのN末端側をエンテロキナーゼで切断し、C末端側のシステインのN末端側で切断反応に付することを特徴とするG P R 8 リガンドまたはその塩の製造法。

12. G P R 8 リガンドが配列番号：4 4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項10または11記載の製造法。

13. G P R 8 リガンドが配列番号：4 4 、配列番号：4 5 、配列番号：4 6 、配列番号：4 7 、配列番号：4 8 、配列番号：4 9 または配列番号：5 0 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項10または11記載の製造法。

20 14. G P R 8 リガンドが配列番号：4 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項10または11記載の製造法。

15. 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質をコードするDNAを含有するDNA。

25 16. 請求項15記載のDNAを含有する組換えベクター。

17. F E R M B P - 8 0 2 3 で標示される形質転換体：エシェリヒア コリ MM294 (DE3) / p T C G P R 3 に保持される請求項16記載の組換えベク

ター。

18. 請求項16記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
19. F E R M B P - 8 0 2 3 で標示される形質転換体：エシェリヒア コリ MM294 (DE3) / p T C G P R 3 である請求項18記載の形質転換体。
- 5 20. 目的ペプチドのN末端側にメチオニン残基またはタンパク質分解酵素切断配列を、C末端側にシステイン残基またはシステイニルペプチド（ただし、システイニルペプチドのペプチド部分は目的ペプチドと異なり、かつN末端側にメチオニン残基を付加する場合、ペプチド部分はメチオニン残基を有さない）を付加して繰り返し連結した前駆体タンパク質またはその塩。
- 10 21. 前駆体タンパク質が請求項18記載の形質転換体を培養して製造された組換え型前駆体タンパク質である請求項4記載の製造法。

1/4

図 1

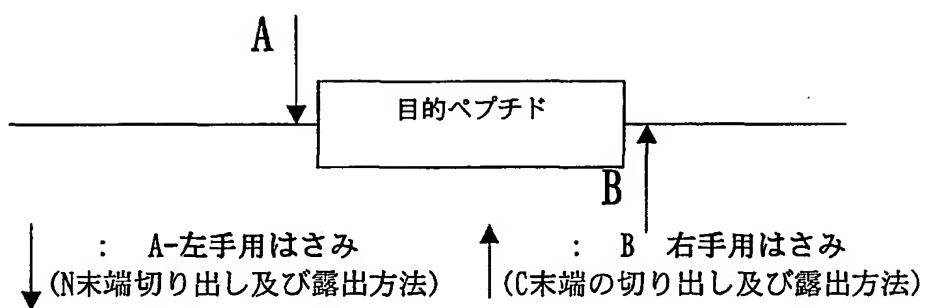


図 2

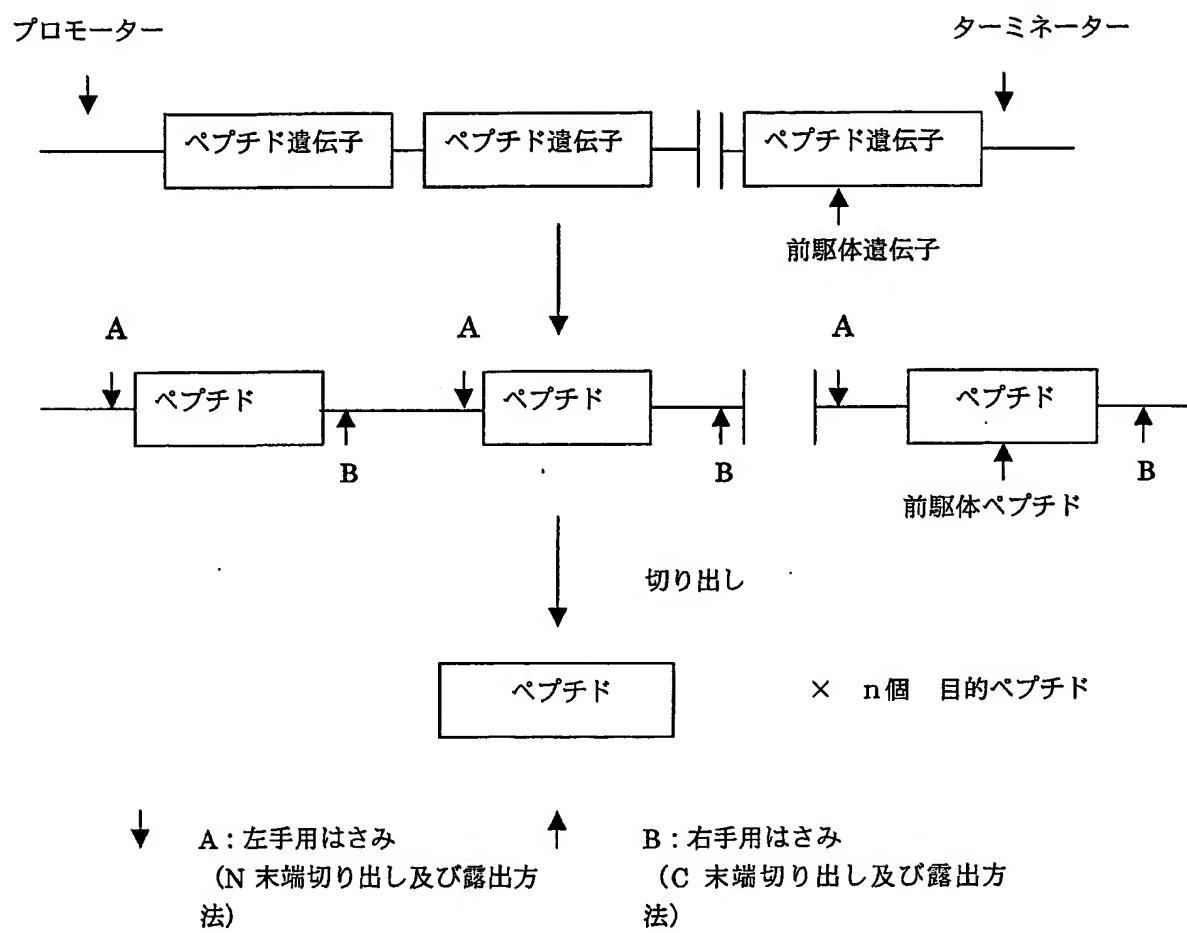
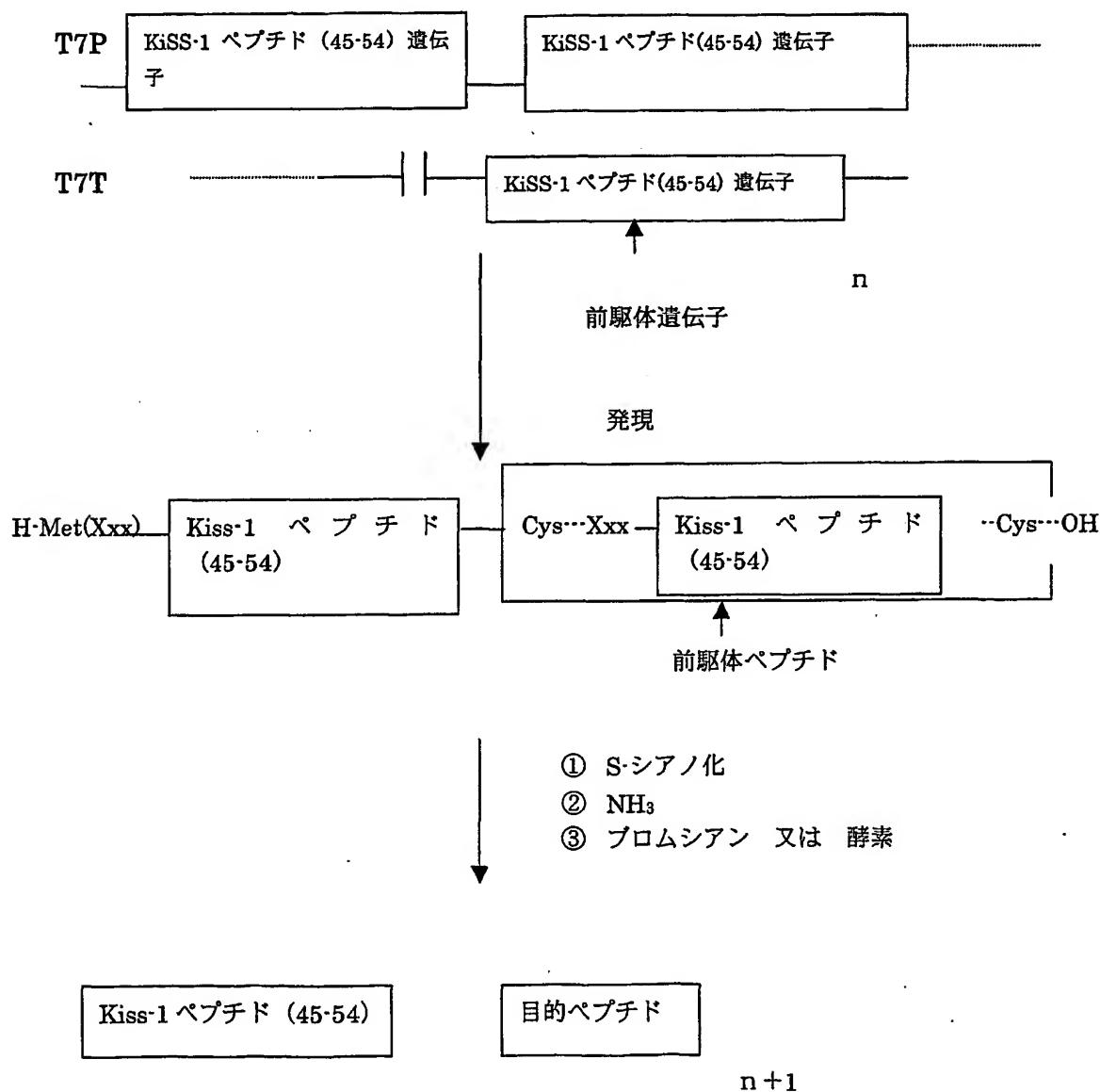


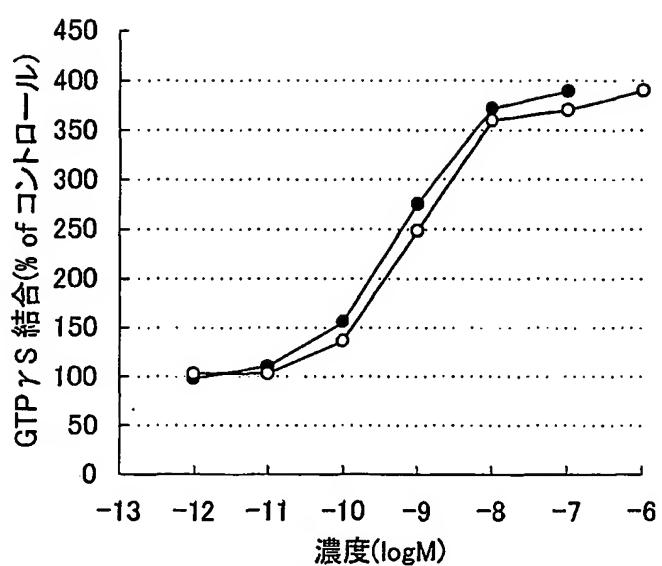
図 3

45 54
KiSS-1ペプチド(45-54) : H-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂



4/4

図 4



[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> A Method for Producing A Peptide

<130> P02-0061PCT

<150> JP 2001-147341

<151> 2001-05-17

<160> 75

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

2/36

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 2

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

5 10

<210> 3

<211> 162

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ggtaacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggtctgtct 60
gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120
gacctgccga actacaactg gaactctttc ggctcgctt tc 162

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

tataactgga acagctttgg tc tgcgttt 30

<210> 5

<211> 144

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

4/36

ggtagcgcga tgtataactg gaacagctt ggtctgcgtt ttgtggctc ggcatgtac 60
aatttgaatt ctttcggcct gcgcitctgc ggctcggcga tgtataactg gaactccctt 120
ggcctgcgt tttcggttc tgct 144

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

1

5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

1

5

10

<210> 8

5/36

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu

1 5 10 15

Pro Leu Arg Phe

20

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile

1 5 10 15

Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn

20 25 30

Leu Pro Leu Arg Phe

35

6/36

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1

5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg

1

5

10

15

Phe

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

agctttgcga atctgccgct gcgtttt 27

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

atgcgcata gcttgcgaa tctgccgctg cgtttt 36

<210> 14

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

atgagcaccc cggcggtgaa taaaatgccg catagcttg cgaatctgcc gctgcgtttt 60

<210> 15

<211> 111

<212> DNA

8/36

<213> Human

<400> 15

agcctgaact ttgaagaact gaaagatgg ggtccgaaaa atgtgattaa aatgagcacc 60
ccggcggtga ataaaatgcc gcatacgctt gcgaatctgc cgctgcgttt t 111

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

gttcctaacc tgccccaaag gttt 24

<210> 17

<211> 51

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

aatatggagg tgaggctcggt gagacgtgtt cctaacctgc cccaaagggtt t 51

<210> 18

9/36

<211> 36

<212> PRT

<213> Human

<400> 18

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Met Pro Phe

35

<210> 19

<211> 108

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

ctggtgacgc ccagagggtc aaggaatggg ccagggccct ggcagggagg tcggaggaaa 60

ttccggccgc agcggcccg cctctcccat aagggaccct tgccttcc 108

<210> 20

<211> 31

10/36

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 20

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> RAT

<400> 21

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

11/36

<213> Human

<400> 22

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Bovine

<220>

<221>

<222>

<223> 10 th Xaa is Ala or Thr, 11 th Xaa is Gly or Ser and 21th Xaa is OH,
Gly or GlyArg.

<400> 23

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Xaa Xaa Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Xaa

12/36

20

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 24

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly

20

25

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 25

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg

19

13/36

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 26

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 27

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

14/36

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 28

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 29

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

15/36

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 30

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 31

<211> 22

<212> PRT

<213> Rat

<400> 31

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

16/36

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> Rat

<400> 32

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Rat

<400> 33

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

<210> 34

17/36

<211> 33

<212> PRT

<213> Rat

<400> 34

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Rat

<400> 35

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

<210> 36

18/36

<211> 21

<212> PRT

<213> Rat

<400> 36

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<400> 37

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

<210> 38

<211> 31

19/36

<212> PRT

<213> Human

<400> 38

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Human

<400> 39

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

<210> 40

<211> 33

<212> PRT

20/36

<213> Human

<400> 40

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 41

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

21/36

<213> Human

<400> 42

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 43

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<400> 43

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Human

22/36

<400> 44

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 45

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> Rat/Mouse

23/36

<400> 46

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu
20

<210> 47

<211> 30
<212> PRT
<213> Human

<400> 47

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala
1 5 10 15
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp
20 25 30

<210> 48

<211> 30
<212> PRT
<213> Porcine

<400> 48

24/36

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp

20 25 30

<210> 49

<211> 30

<212> PRT

<213> Rat

<400> 49

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

20 25 30

<210> 50

<211> 30

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 50

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

25/36

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Gln Tri

20 25 30

<210> 51

<211> 69

<212> DNA

213 Human

<400> 51

tggtaacaagg acgtggcgag tccccgcgtac cacacggtgcc gcccgcgcgc tggcctgctc 60

atggggctg 69

<210> 52

<211> 69

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 52

tggtaacaagg acacggcgag tccccgtac cacacggtg ggcgcgcgc gggctgctc 60

atggggctg 69

<210> 53

26/36

<211> 69

<212> DNA

<213> Rat/Mouse

<400> 53

tggtacaagg acgtggcgag ccctcgat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
atggggctg 69

<210> 54

<211> 90

<212> DNA

<213> Human

<400> 54

tggtacaagg acgtggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60
atggggctgc gtcgctcacc ctatctgtgg 90

<210> 55

<211> 90

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 55

27/36

tggtacaagg acacggcgag tccccgtac cacacggtgg gccgcgcgcg 60
atggggctgc gccgctcgcc ctacatgtgg 90

<210> 56

<211> 90

<212> DNA

<213> Rat

<400> 56

tggtacaagg acgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
atggggctgc gccgctcgcc ctaccctgtgg 90

<210> 57

<211> 90

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 57

tggtataagg acgtggcgag tccccgtat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60
atggggctgc gccgctcgcc ctaccagtgg 90

<210> 58

<211> 5

28/36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 59

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 59

gatgacgacg acaag

15

<210> 60

<211> 4

29/36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 60

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 61

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 61

attgaaggcc gc

12

<210> 62

<211> 3

30/36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 62

Gly Pro Arg

1

<210> 63

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 63

ggcccgcg

9

<210> 64

<211> 288

31/36

<212> DNA

<213> Human

<400> 64

gatgacgatg acaaatggta taaacatgtg gcgagccgc gttatcatac cgccccgc 60
gcggccggtc tgctgatggg cctgtgtcaa ttgggtggtg atgacgatga caaatggtat 120
aaacatgtgg cgagcccgcg ttatcatacc gtggccgcg cggccggct ctgtatggc 180
ctgtgtgagc tcggctctga cgacgatgat aaatggtaca aacacgttgtc 240
taccacacgg ttggtcgtgc cgccggcctg ctgatggtc tgtcggt 288

<210> 65

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 65

tatggatgac gatgacaaat ggtataaaca tgtggcgagc ccgcgttatac ataccg 56

<210> 66

<211> 64

32/36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 66

gcgcggccca cggatgata acgcgggctc gccacatgtt tataccattt gtcatgtca 60
tcca 64

<210> 67

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 67

tggccgcgc ggccggctcg ctgatgggcc tgtgtcaatt gggtttgaac ttctctgtct 60
ccgcgcgcgg ag 72

<210> 68

33/36

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 68

gatccctccgg cggcgagac agagaagttc aaacccaatt gacacaggcc catcagcaga 60
ccggcc 66

<210> 69

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 69

aattgggtgg tcatgacgtt gacaaatggtaataaacatgt ggcgagcccccg cgttatcata 60
ccg 63

<210> 70

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 70

cggcccacgg tatgataacg cgggctcgcc acatgtttat accatttgtc atcgtcatca 60
ccaccc 66

<210> 71

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 71

tggccgcgc ggccggcttg ctgatggcc tgtgtgagct cggctctgac gacgatgata 60
aatggta 68

<210> 72

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 72

caacgtgtt gtaccattta tcatcgctgt cagagccgag ctcacacagg cccatcagca 60

gaccggcc 68

<210> 73

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 73

aaacacgttg cctccccgcg ctaccacacg gttggtcgtg ccgcgggcct gctgatgggt 60

36/36

ctgtgcggtt gag

73

<210> 74

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligomer

<400> 74

gatcctcaac cgcacagacc catcagcagg cccgcggcac gaccaaccgt gtggtagcgc 60

ggggagg

67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12P21/02, C12N15/09, C07K19/00, C07K14/47, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12P21/02, C12N15/09, C07K19/00, C07K14/47, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 5-320196 A (Sankyo Co., Ltd.), 03 December, 1993 (03.12.93), (Family: none)	1, 4/2, 3, 5-16, 18, 20, 21
Y/A	JP 2000-270871 A (Takeda Chem. Ind. Ltd.), 03 October, 2000 (03.10.00), (Family: none)	2, 3, 5-16, 18, 20, 21/ 17, 19
Y/A	EP 887417 A (Takeda Chem. Ind. Ltd.), 30 December, 1998 (30.12.98), & JP 11-71396 A	8-14/1-7, 15-21
A	WO 00/36122 A (Takeda Chem. Ind. Ltd.), 22 June, 2000 (22.06.00), & EP 1138772 A & JP 2000-228991 A	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 18 July, 2002 (18.07.02)	Date of mailing of the international search report 30 July, 2002 (30.07.02)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12P21/02, C12N15/09, C07K19/00, C07K14/47, C12N1/21

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12P21/02, C12N15/09, C07K19/00, C07K14/47, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 5-320196 A (三共株式会社) 1993.12.03 ファミリーなし	1, 4/2, 3, 5-16, 18, 20, 21
Y/A	JP 2000-270871 A (武田薬品工業株式会社) 2000.10.03 ファミリーなし	2, 3, 5-16, 18, 20, 21/ 17, 19
Y/A	EP 887417 A (TAKEDA CHEM IND LTD.,) 1998.12.30 & JP 11-71396 A	8-14/1-7, 15-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18.07.02	国際調査報告の発送日 30.07.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 新見 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448  4B 9162

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/36122 A (TAKEDA CHEM IND LTD.,) 2000.06.22 & EP 1138772 A & JP 2000-228991 A	1-21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.